

Otoimmün Büllöz Hastalıkların Tanısında Tzanck Sitoloji

Tzanck Cytology in Diagnosis of Autoimmune Bullous Diseases

Murat Durdu

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi, Adana, Türkiye

Özet

Sitoloji hücrelerin karakteristik özelliklerini incelemeye dayalı basit, hızlı, tekrarlanabilir ve ucuz bir tanı yöntemidir. Dermatolojik hastalıkların tanısı için sitoloji ilk kez Arnault Tzanck tarafından 1947'de uygulanmıştır. Bu tarihten sonra Tzanck sitoloji pek çok eroziv-vezikülobüllöz, nodüler ve tümöral deri lezyonunun tanısında kullanılmıştır. Günümüzde sitoloji en sık herpetik enfeksiyonlar, kutanöz leishmaniasis, lepra ve otoimmün büllöz hastalıkların tanısında kullanılır. Otoimmün büllöz hastalıklarda sitolojinin kullanım amacı pemfigusu subepidomal otoimmün büllöz hastalıklardan hızla ayırt etmektir. Bu makalede otoimmün büllöz hastalıkların tanısında sitolojik örneklerin alınma ve boyama yöntemleri ve sitolojik bulguları gözden geçirilmektedir. (*Türkderm 2011; 45 Özel Sayı 1: 39-43*)

Anahtar Kelimeler: Sitoloji, pemfigoid, pemfigus, Tzanck yayma

Summary

Tzanck smear test is a simple, rapid, repeatable, and inexpensive diagnostic method based on the investigation of characteristics of individual cells. For diagnosis of cutaneous diseases, cytology was first used by Arnault Tzanck in 1947. After this date, Tzanck cytology has been used in the diagnosis of various erosive-vesiculobullous, nodular, and tumoral skin lesions. In daily dermatology practice, the most common use areas of cytology are diagnosis of herpetic infections, cutaneous leishmaniasis, leprosy, and autoimmune bullous diseases. The purpose of cytology in autoimmune bullous diseases is to rapidly distinguish pemphigus from subepidermal bullous disease. In this review article, taking and staining methods of cytologic specimen for the diagnosis of autoimmune bullous diseases, and the cytologic findings have been reviewed. (*Turkderm 2011; 45 Suppl 1: 39-43*)

Key Words: Cytology, pemphigoid, pemphigus, Tzanck smear

Giriş

Sitoloji hücrelerin karakteristik özelliklerini incelemeye dayalı bir tanı yöntemidir¹. İlk sitolojik incelemeler 17. yüzyılda mikroskopun keşfedilmesi sonrası canlıların hücrelerden oluştuğunun tespiti ile başlamıştır. On dokuzuncu yüzyılın ortalarında, vücuttan elde edilen çeşitli materyaller boyanmaksızın direkt mikroskop altında incelenmiştir. Sonraki yıllarda sitolojik boyaların kullanılmaya başlaması ile mikroskopik incelemeler kolaylaşmış ve tıpta kullanım alanları artmıştır². Der-

matolojik hastalıklarda sitoloji, ilk kez 1947 yılında Arnault Tzanck tarafından uygulanmıştır. Tzanck, başta büllöz hastalıklar ve tümöral hastalıklar olmak üzere pek çok dermatolojik hastalığın sitolojik bulgularını rapor etmiştir. Sonraki yıllarda, dermatolojik hastalıklarda uygulanan sitolojik incelemeler onun adı ile anılmaya başlanmıştır³. Günümüze kadar Tzanck sitolojisi pek çok eroziv-vezikülobülloz, nodüler ve tümöral hastalıkların tanısında kullanılmıştır⁴⁻⁷. Buna rağmen, Tzanck sitolojinin dermatolojik hastalıkların tanısında rutin kullanımı, çoğu dermatoloji kliniğinde herpetik enfeksiyonlar, pemfigus, kutanöz leishmaniasis ve lep-

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Murat Durdu, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, 01250 Yüreğir, Adana, Türkiye E-posta: sivandr@hotmail.com

*Türkderm-Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından basılmıştır.
Turkderm-Archives of the Turkish Dermatology and Venerology, published by Galenos Publishing.*



ra tanısıyla sınırlı kalmıştır. Bunun en büyük nedeni ise sitolojinin avantajlarının yeterince anlaşılmasındır⁴ (Tablo 1). Otoimmün büllöz hastalıklarda sitoloji, pemfigusun pemfigoid grubu otoimmün büllöz hastalıklardan hızla ayırt edilmesi, nüksi lezyonların saptanması ve sekonder enfeksiyonların tespiti amacıyla kullanılır⁷.

Burada sitolojik inceleme yapmak için hangi malzemelerin gerektiği, eroziv-vezikülobüllöz lezyonlarda sitolojik örneklerin nasıl alındığı, alınan örneklerin hangi sitolojik boyalarla boyanması gerektiği, otoimmün büllöz hastalıklarda hangi sitolojik bulguların gözlemlendiği anlatılmaya çalışıldı.

Sitolojik İnceleme İçin Gerekli Malzemeler

Deri lezyonlarından sitolojik inceleme yapmak için lam, bistüri (No:15), spanç, antiseptik solüsyon, immersiyon yağı, sitolojik boya ve binoküler mikroskop gerekir. Oral mukoza örnekleri ise fırça, künt uçlu tahta veya metal spatula yardımı ile alınabilir. Tüm bu malzemeler her dermatoloji kliniğinde bulunmaktadır⁷.

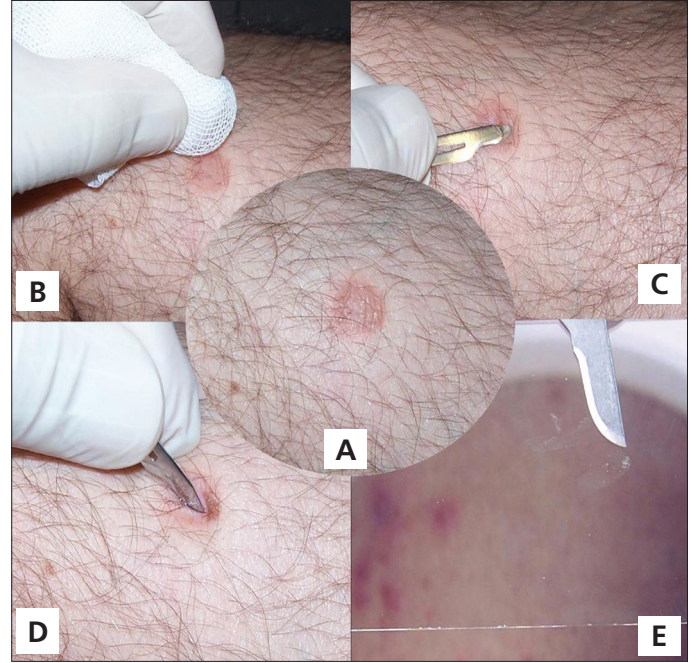
Örneklerin Alınması

Eroziv-vezikülobüllöz lezyonlarda sitolojik inceleme için örnekler kazıntı (scraping) yöntemi ile alınır. Örnek almak için en genç vezikül veya bül seçilmelidir (Resim 1A). Eski lezyonlardan örnek alındığında sekonder enfeksiyonlar ve hücresel dejenerasyona bağlı gelişen sitolojik değişiklikler yanıltıcı olabilir⁸. İşlem öncesi lezyon %70 alkollü spanç ile silinir (Resim 1B). Artefakta neden olduğu için spanç yerine pamuk tercih edilmemelidir. Örnek alınırken vezikül veya bülün tavanı bistüri (No:15) yardımı ile açılır (Resim 1C). Bül sıvısı, hücrelerin dilüe olmasına ve yanlış negatif sonuçlara neden olabileceğinden, tabanına dokunmadan spanca emdirilir. Lezyon tabanı bistüri yardımı ile kanamaya yol açmadan nazikçe kazınarak en az iki lam üzerine ince bir tabaka oluşturacak şekilde yayılır (Resim 1D, 1E). Üzeri krutlu lezyonlarda krut steril bir pens yardımı ile çıkarıldıktan sonra tabanı kazınmalıdır⁷. Oral veya genital mukoza lezyonlarından örnek alınırken bistüri kolayca kanamaya neden olur. Bu nedenle künt uçlu spatula (metal veya tahta) veya fırça (diş fırçası veya si-

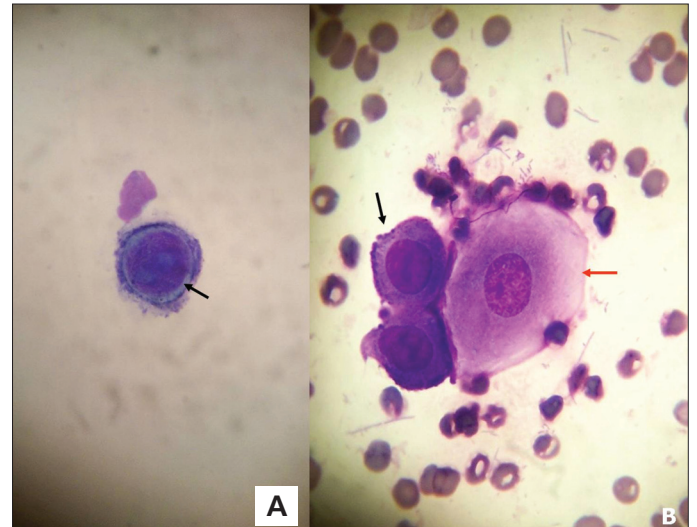
toloji için özel hazırlanmış fırçalar) yardımı ile alınabilir^{7,8}. Örnek alınırken kanama olursa serum fizyolojikli spanç ile baskı yapılabilir.

Sitolojik Örneklerin Boyanması

Deriden alınan sitolojik örneklerin rutin boyanması için Giemsa, Wright, May-Grünwald-Giemsa, Diff-Quick, Papanicolaou ve hematoksilen eozin kullanılabilir. Son yıllarda, hızlı boyama olanağı sağlaması nedeniyle May-Grünwald-Giemsa (20-



Resim 1. Sitolojik örnek alma yöntemi. Pemfiguslu hastada bacakta büllöz lezyon (A), alkollü spanç ile silme (B), bistüri yardımı ile bülün tavanının açılması (C), bistüri ile bül tabanının kazınması (D), elde edilen materyalin ince tabaka halinde lam üzerine yayılması (E)



Resim 2. Perinükleer halosu (ok) bulunan akantolitik hücre (A), normal keratinosit (kırmızı ok) ve akantolitik hücre (siyah ok) (B) (May-Grünwald-Geimsa X1000)

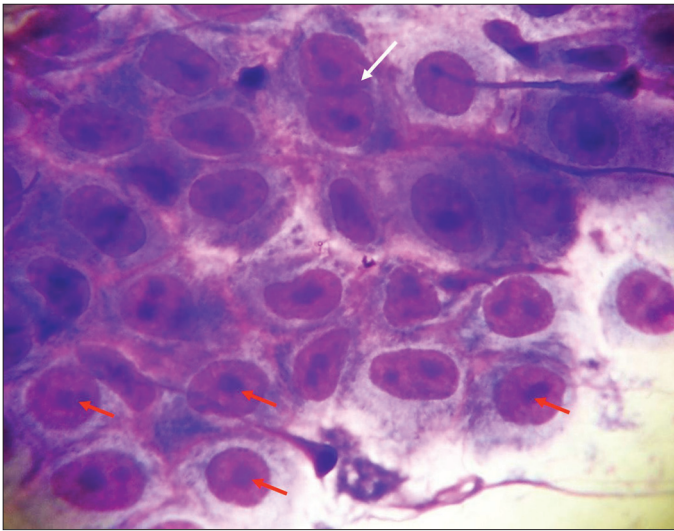
Tablo 1. Sitolojik incelemenin avantajları^{1,4,5,7}

- 1. Ucuz:** Rutin sitolojik incelemenin maliyeti yaklaşık 1 TL'dir.
- 2. Hızlı:** Hızlı boyama yöntemleri sayesinde yaymalar bir dakikadan kısa sürede boyanabilir ve birkaç dakika içerisinde mikroskop altında incelenebilir.
- 3. Nispeten ağrısız:** Örneklerin alınması için anestezi gerektirmez. Çocuklarda örnekler ağlatmadan alınabilir.
- 4. Tekrarlanabilir:** Nüksi lezyonların tanısında kullanılabilir. Çok sayıda farklı lezyonu bulunan hastalarda ayrı yayma yapılabilir.
- 5. Uygun örnek alındığında sadece patolojik hücreler gözlenir.**
- 6. Biyopsi almanın güç olduğu bölgelerde kullanılabilir.**

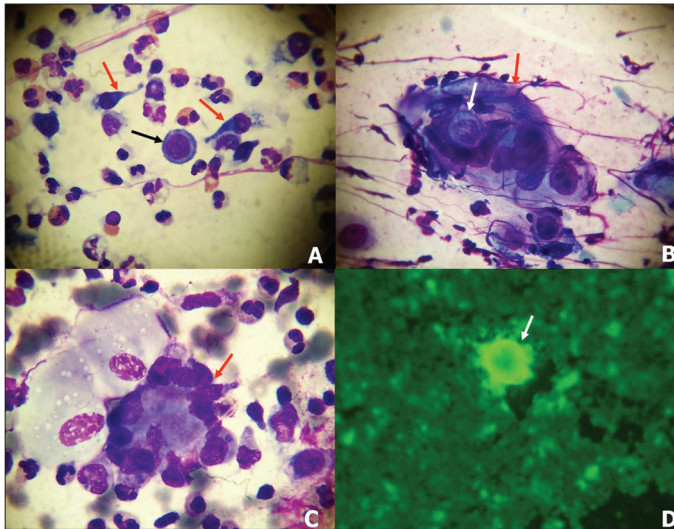
25 saniye) ve Diff-Quick (2 dakika) boyalarının dermatolojik sitolojide kullanımı artmıştır^{1,9}.

Alınan örnekler Papanicolaou ve hematoksilen eozin ile boyanacaksa hemen alkol veya formol ile tespit edilmesi gerekir. Papanicolaou ve son zamanlarda geliştirilen hızlı boyanan formu (Cytocolor) özel geliştirilmiş spreyle de (Mercofix) tespit edilebilir. Diğer sitolojik boyamalar için tespit yapılması gerekmez. Ancak havada uzun süre kuruma hücrelerin sitoplazmik özelliklerini değiştirdiğinden alınan örneklerin fazla bekletilmeden boyanması gerekir^{7,9}.

Pemfigus düşünülen hastalarda veya sitolojik incelemede sadece akantolitik hücre tespit edilmesi durumunda, sitolojik örneklerden immüno Floresan incelemede yapılabilir. Bu işlem



Resim 3. Grup yapmış akantolitik hücrelerde nükleolus belirginleşmesi (kırmızı ok) ve iki nükleuslu hücre (beyaz ok) (May-Grünwald-Geimsa X1000)



Resim 4. Tadpole hücresi (kırmızı ok) ve akantolitik hücre (siyah ok) (A), akantolitik hücre (beyaz ok) fagosite etmiş multinükleer dev hücre (kırmızı ok) (B), rozet formasyonu (ok) (C), akantolitik hücre çevresinde IgG depolanması (ok) (D) (A, B, C, May-Grünwald-Geimsa X1000; D, Direkt immüno Floresan inceleme x400)

için havada kurutulmuş yaymaların üzerine floresanla işaretli anti-human IgG damlatılarak 30 dakika bekletilir. Fosfat tamponlu saline (PBS) solüsyonu içerisinde 3 kez 5'er dakika yıkanır. Üzerine tamponlanmış gliserol yerleştirilerek immüno Floresan mikroskopta incelenir. Eğer yaymalar hemen boyanacaksa -20 derecede depolanabilir^{7,10}.

Mikroskopik İnceleme

Sitolojik inceleme yapılırken önce x10 objektif ile tüm alanlar taranarak yeterli hücre alınıp alınmadığı tespit edilir. Yeterli hücre alınmamış ise örnek alımı tekrarlanmalıdır. Yayımda hangi hücrelerin olduğu, akantolitik hücre ve multinükleer dev hücre olup olmadığı x10 büyütmede görülebilir. Bu hücreler tespit edildiğinde x40 ve x100'lük objektifler kullanılarak sitoplazma ve nükleus özellikleri ayrıntılı olarak incelenir. Boyalı preparatlar incelenirken mikroskopun kondansatörü en üst noktaya getirilmeli, x100 objektif ile inceleme yapılırken lam üzerine immersiyon damlatılmalıdır⁷.

Sitolojik Bulgular

Pemfiguslu Hastalarda Sitolojik Bulgular

Pemfigus, sitolojik olarak tek veya küme yapmış şekilde görünen yuvarlak veya oval şekilli akantolitik hücrelerle karakterizedir. Bu hücrelerin sitoplazma yüzeyi düz olabileceği gibi testere dişi şeklinde sitoplazmik uzantılar içerebilir¹¹. Dar, bazofilik sitoplazma, nükleus çevresinde daha soluk (perinükleer halo) periferde ise daha koyu boyanır (kederli kenar) (Resim 2A). Akantolitik hücrelerin nükleus/sitoplazma oranı nükleus lehine bozulmuştur (Resim 2B). Hücre nükleusları yuvarlak ve hiperkromatik olup iki ile beş arasında değişen belirgin nükleolus içerir. Mitoza giden hücreler nedeniyle çok sayıda iki nükleuslu hücre gözlenebilir¹² (Resim 3).

Az sayıda iribaş (tadpole) hücresi pemfigusta gözlenebilmekle birlikte pemfigus herpetiformiste spongiotik dermatitlerin göstergesi olan x100 büyütmede 10'dan fazla sayıda iribaş hücresi gözlenebilir (Resim 4A). Bu hastalarda akantolitik hücre sayısı az olduğundan, doğru sitolojik tanı için, tüm alanların ayrıntılı incelenmesi gerekir⁵.

Pemfigusta özellikle kronik lezyonlardan yayma yapıldığında akantolitik hücreyi fagosite etmiş multinükleer dev hücreler görülebilir (Resim 4B). Bu dev hücreler akantolitik tip skuamöz hücreli karsinomada da rapor edilmiştir¹³.

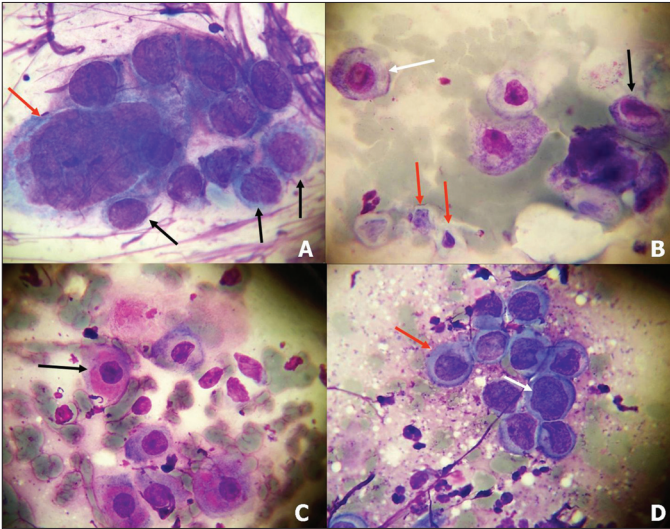
Pemfiguslu hastalarda sitolojik incelemede gözlenen inflammatuar hücreler çoğunlukla nötrofil ve eozinofillerdir. Bu inflammatuar hücreler adezyon molekülleri sayesinde keratinositler çevresinde rozet şeklinde (Sertoli'nin rozet formasyonunu) yerleşebilir veya zincir şeklinde (streptosit) birbirlerine tutunabilir^{1,7} (Resim 4C). Bu bulgular pemfigusa özgü değildir. Rozet formasyonu herpetik enfeksiyonların %25'i ve diğer vezikülobüllöz hastalıkların %10'unda, streptositler ise pemfigoid grubu hastalıklarda gözlenir^{7,14}.

Akantolitik hücreler pemfigus dışında birçok deri hastalığında gözlenebilmesi nedeniyle pemfigusa özgü keratinosit çevresinde immüno globulin depolanmasının gösterilmesi gerekir

(Resim 4D). Yayma materyallerinden yapılan direkt immüno- floresan incelemelerde keratinositler çevresinde IgG depolan- ması olguların %86-100'ünde tespit edilir^{5,15,16}.

Pemfigusun sitolojik ayırıcı tanısı: Pemfigus klinik, sitolojik ve histopatolojik olarak akantolize yol açan diğer hastalık- larla karışabilir. Özellikle oral ve genital mukoza lezyonla- rından yapılan sitolojik incelemede pemfigus ile en sık karış- şan hastalık herpetik enfeksiyonlardır⁵. Pemfigus nedeniyle immünoşüpresif tedavi alan hastalarda gözlenen oral veya genital bölge lezyonlarında da herpetik enfeksiyonların ekarte edilmesi gerekir. Herpetik enfeksiyonlar için en ka- rakteristik sitolojik bulgu multinükleer dev hücrelere eşlik eden akantolitik hücrelerdir^{5,11} (Resim 5A). Multinükleer dev hücreler birbirlerine yapışık (sinsityal nükleus) 3 veya daha fazla nükleustan oluşur. Nükleuslar bazen sayılamayacak ka- dar çok sayıda olabilir ve hücreyi 60-80 µm'ye kadar büyüte- bilir¹. Bu bulguların pozitiflik oranı ilk üç günde oldukça yüksekken süre uzadıkça pozitiflik oranı azalır. Herpetik enfeksiyonlara özgü intranükleer inklüzyon cisimciklerini (Cowdry A cisimcikleri) May-Grünwald-Giemsa ile tespit et- mek güç olmasına rağmen Papanicolaou ve Romanowski bo- yaları ile kolayca saptanabilir⁷.

Akantolitik bir hastalık olması nedeniyle Darier hastalığı da klinik, histopatolojik ve sitolojik olarak pemfigus ile karışabi- lir. Pemfigustan farklı olarak, Darier hastalığında akantolitik hücrelere corps rond ve grain eşlik eder¹ (Resim 5B). Corps rond yuvarlak şekilli, hiyalen asidofilik sitoplazmalı ve çevre- sinde halosu bulunan piknotik keratinositlerdir. Grain ise corps rondun son ürünüdür. Grainlerin nükleusları oval olup çevresinde homojen diskeratotik materyalle çevrilidir. Eğer lezyon enfekte değilse pemfigusun aksine çok fazla inflama- tuar hücre gözlenmez^{7,9}.



Resim 5. Herpetik enfeksiyonda akantolitik hücreler (siyah oklar) ve multinükleer dev hücre (kırmızı ok) (A), Darier hastalığında akantolitik hücre (beyaz ok), corpus rond (siyah ok) ve grainler (kırmızı oklar) (B), büllöz impetigoda diskeratotik akantolitik hücre (ok) (C), akantolitik tip skuamöz hücreli karsinomada akantolitik hücre (kırmızı ok) ve nükleus kontür düzensizliği (beyaz ok) (D) (May-Grünwald-Geimsa X1000)

Çocuklarda büllöz impetigo ve stafilokoksik haşlanmış deri sendromu klinik ve sitolojik olarak pemfigus ile karışabilir. Büllöz impetigoda akantolitik hücrelerin bazıları diskeratotik- tir (Resim 5C). Sitolojik incelemede diskeratotik akantolitik hücreler ile birlikte yoğun nötrofil ve kokların gözlenmesi büllöz impetigo için tanısaldır. Stafilokoksik haşlanmış deri sendromunda ise kok ve nötrofiller olmaksızın sadece diskeratotik akantolitik hücreler gözlenir⁵.

Hailey-Hailey hastalığında da, pemfigusta olduğu gibi, sadece akantolitik hücreler gözlenir. İki hastalık arasında sitolojik ayırım direkt immüno floresan inceleme ile yapılabilir. Yaymalardan ya- pılan immüno floresan incelemede akantolitik hücre çevresinde IgG depolanması saptanması pemfigus lehine iken bu bulgunun negatif olması Hailey-Hailey hastalığını düşündürür^{5,7,15,16}.

Pemfigus herpetiformisli olgularda akantolitik hücreler az sa- yıda olduğundan gözden kaçabilir ve çok sayıda tadpole hücre yanı sıra spongiotik dermatit olarak değerlendirilebilir. Bu hastalarda yaymanın tüm alanlarının ayrıntılı incelenmesi ve yaymadan immüno floresan inceleme yapılması spongiotik dermatitlerden ayırmda önemlidir⁵.

Pemfiguslu olgularda gözlenen nükleolus belirginleşmesi, mitozda artış ve akantolitik hücre içeren dev hücreler akan- tolitik tip skuamöz hücreli karsinoma ile karışabilir. Akanto- litik tip skuamöz hücreli karsinomada akantolitik hücrelerde nükleer kontür düzensizliğinin olması, poikilositoz ve poiki- lokaryozis olması ve direkt immüno floresan incelemede IgG depolanmasının negatif olması pemfigustan ayırt edici nok- talardır^{4,7} (Resim 5D).

Diğer Otoimmün Büllöz Hastalıklar

Büllöz pemfigoid ve diğer subepidermal otoimmün büllöz hastalıkların sitolojik bulgusu tanısaldır. Sitolojik incele- mede normal poligonal keratinositler ve az sayıda iribaş hücre- si gözlenir. Zeminde eozinofil, nötrofil ve lenfositlerden oluşan inflamatuvar hücreler saptanır. Bu hastalıklarda pemfi- gustan farklı olarak akantolitik hücre gözlenmez^{5,16}.

Sonuç

Günümüzde otoimmün hastalıkların tanısında yeni yöntemler ge- liştirilmesine rağmen sitoloji halen pemfigusun diğer otoimmün hastalıklardan ayırt edilmesi ve sekonder herpetik enfeksiyonların tespitinde kullanılan hızlı, ucuz ve kolay uygulanabilir bir tanı yöntemidir. Bununla birlikte otoimmün hastalık tanısının histopa- tolojik ve immüno floresan incelemeler ile desteklenmesi gerekir⁷.

Kaynaklar

1. Ruocco V, Ruocco E: Tzanck smear, an old test for the new millennium: when and how. *Int J Dermatol* 1999;38:830-4.
2. Spriggs AI: History of cytodiagnosis. *J Clin Pathol* 1977;30:1091-102.
3. Hunter JAA, Holubar K: The man behind the eponym. *Am J Dermatopathol* 1985;7:121-3.
4. Canti G: Rapid cytologic diagnosis of skin lesions. *Advance in clinical cytology*. Ed. Koss LG, Coleman DV. New York, Masson Publishing, 1984;243-66.

5. Durdu M, Baba M, Seçkin D: The value of Tzanck smear test in diagnosis of erosive, vesicular, bullous, and pustular skin lesions. *J Am Acad Dermatol* 2008;59:958-64.
6. Durdu M, Baba M, Seçkin D: More experiences with the Tzanck smear test: cytologic findings in cutaneous granulomatous disorders. *J Am Acad Dermatol* 2009;61:441-50.
7. Ruocco V: Cytodiagnosis in dermatology. Naples, Cooperativa Libraria Universitaria, 1980; 20-110.
8. Haber H: Cytodiagnosis in dermatology. *Br J Dermatol* 1954;66:79-94.
9. Gupta LK, Singhi MK: Tzanck smear: a useful diagnostic tool. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2005;71:295-9.
10. Ruocco V, Coscia-Porrazzi L, Pisani M: Reliability of cytodiagnosis in oral pemphigus vulgaris. A study of 30 cases. *J Dermatol* 1984;11:535-40.
11. Blank H, Burgoon CF: Abnormal cytology of epithelial cells in pemphigus vulgaris: a diagnostic aid. *J Invest Dermatol* 1952;18:213-23.
12. Kobayashi TK, Kaneko C, Sugishima S, Kusukawa J, Kameyama T: Scrape cytology of oral pemphigus. Report of a case with immunocytochemistry and light, scanning electron and transmission electron microscopy. *Acta Cytol* 1999;43:289-94.
13. Medak H, Burlakow P, McGrew EA, Tiecke R: The cytology of vesicular conditions affecting the oral mucosa: pemphigus vulgaris. *Acta Cytol* 1970;14:11-21.
14. Nieboer C, Beljaards R, van der Veen JP: Rosette-formation in herpes simplex and herpes zoster lesions as demonstrated in Tzanck smears. *Arch Dermatol Res* 1987;279:283-4.
15. Aithal V, Kini U, Jayaseelan E: Role of direct immunofluorescence on Tzanck smears in pemphigus vulgaris. *Diagn Cytopathol* 2007;35:403-7.
16. Kabir AK, Kamal M, Choudhury AM: Clinicopathological correlation of blistering diseases of skin. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 2008;34:48-53.